**Iranian Journal of Animal Science Research**
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

**Research Paper**
**Vol. 14, No. 1, Spring 2022, p. 109-120**

# Improving of frozen-thawed sperm quality in commercial broiler breeder roosters challenged with dexamethasone using diet vitamin E supplementation

**Zabihollah Nemati[1*] Mohammad Sattari[2], Amir Karimi[3], Maghsoud Besharati[1], Namdar Kamrani[2]**

| Received: 07-02-2021<br>Revised: 17-06-2021<br>Accepted: 05-07-2021<br>Available Online: 07-06-2022 | **How to cite this article:**<br>Nemati, Z., M. sattari, A. Karimi, M. Besharati and N. Kamrani. 2022. Improving of frozen-thawed sperm quality in commercial broiler breeder roosters challenged with dexamethasone using diet vitamin E supplementation. Iranian Journal of Animal Science Research 14(1):109-120.<br>DOI:10.22067/ijasr.2021.687251.1007 |
|---|---|

**Introduction:** Oxidative stress is an imbalance between the free radicals and the ability of the body to counteract or detoxify their harmful effects by antioxidants. Commercial poultry faces a wide range of environmental, technological, nutritional, and biological stresses, which are responsible for low productivity and reproductive performance in poultry. In addition, chronic oxidative stress can deplete antioxidant vitamins and trace elements, impair immune function resulting in significant economic losses to the poultry industry. Most of this stresses at the molecular level are associated with oxidative stress and damage to important biological molecules. High levels of fatty acids are found in the plasma membrane of sperm cells. Fatty acids and other lipid compounds in sperm membranes play an important role in regulating spermatogenesis, sperm maturation, acrosome reaction, capacity building, and membrane fusion. Specifically, sperm lipid peroxidation disrupts these functions and inhibits spermatogenesis. Oxidation of sperm fatty acids leads to the production of free oxygen radicals (ROS), which are normally necessary for physiological processes of sperm, but excessive production of ROS in sperm causes low membrane fluidity, DNA breakdown (directly by attacking the purine and pyrimidine bases), protein damage, and ultimately reduced sperm motility and fertility. ROS cause damage via single and double strand DNA breaks, cross links, and chromosomal rearrangements) vitamin E is one of the most important natural antioxidants and effective in preventing of the spermatozoa lipids oxidation. Consumption of high amounts of vitamin E (200 mg / kg diet) increases its concentration in blood and semen plasma and causes beneficial changes in antioxidant capacity and lipid profile of rooster semen in normal conditions. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of diet supplementation with vitamin E on the quality of frozen-thawed sperm in breeder rooster under dexamethasone-induced oxidative stress.

**Material and Methods:** A total of 18 roosters of Ross 308 broiler breeder at 28 weeks of age were completely randomized with 3 experimental groups and 6 birds in each experimental group. Experimental groups include 1- Normal rooster fed basal diet (control) 2- Roosters treated with subcutaneous injection of dexamethasone 4 mg / kg body weight (DEX) 3- Dex + Vitamin E (200 mg / kg diet). After 2 weeks of habitation period and 3 weeks after experimental treatments, semen samples of roosters were collected twice a week from each rooster using abdominal massage method. Sperm viability was assessed by eosin-negrosin staining. For this purpose, mix 10 µl of diluted semen with 20 µl of dye containing eosin dye (1.67 g), nigrosin dye (10 g) and sodium citrate (2.9 g) in 100 ml of distilled water. The viability of sperm was examined by light microscope (Olympus, Japan) with a

1-Associate Professor, Department of Animal science, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- MSc Graduate student, Department of animal science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3-Assistant Professor, Department of Animal science, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Corresponding Author Email: znemati@tabrizu.ac.ir

magnification of 400 × and sperms that were completely or partially reddish and those did not stain were considered died and live sperm respectively. Qualitative characteristics of sperm including viability, percentage of total (MOT, %), and progressive motility (PROG, %), plasma membrane integrity as well as malondialdehyde content, antioxidant capacity (TAC) and activity of glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase enzymes (SOD) were evaluated. Statistical analyses were performed using SAS software version 9.1. Duncan’s test was used to compare groups.

**Results and Discussions:** The results showed that dexamethasone injection as a cause of oxidative stress, increases lipid peroxidation (9.11) and decreases antioxidant capacity (1.01) of sperm (P<0.05). Total motility (49.16), progressive motility (12.46), survival rate (50.84) and plasma membrane integrity (50.26) significantly decreased by DEX treatment (P<0.05). Dietary supplementation with vitamin E improves total motility (73.63), survival rate (74.12) and plasma membrane integrity (72.74), antioxidant capacity (1.50) and activity of glutathione peroxidase (73.58), superoxide dismutase (144.95) and reduction of malondialdehyde (4.61) compared to the other two groups (P<0.05). Progressive motility (26.33) was highest in the control group compared to the other two groups and Lateral Head Displacement (16.08) was higher in the dexamethasone group than the other experimental groups (P<0.05). These positive effect vitamin E on sperm quality could be due to its antioxidant properties.

**Conclusion:** It can be concluded that dexamethasone injection increases lipid peroxidation and decreases sperm quality. Addition of vitamin E to the broiler breeder rooster’s diet under oxidative stress condition improves the quality of frozen thawed sperm. Therefore, it is recommended to supplement the diet of broiler breeder roosters with vitamin E under oxidative stress conditions.

**Keywords:** Frozen-thawed sperm, Oxidative stress, Rooster, Vitamin E.

**نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران**
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

**مقاله پژوهشی**

# بهبود کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های گله مادر تجاری چالش داده شده با دگزامتازون با استفاده از مکمل غذایی ویتامین E

**ذبیح اله نعمتی [1*]، محمد ستاری [2]، امیر کریمی [3] مقصود بشارتی [1]، نامدار کامرانی [2]**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۳/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۴

نعمتی، ذ.، م. ستاری، ا. کریمی، م. بشارتی، و ن. کامرانی. ۱۴۰۱. بهبود کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های گله مادر تجاری چالش داده شده با دگزامتازون با استفاده از مکمل غذایی ویتامین E. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۴(۱).۱۲۰-۱۰۹.

## چکیده

این آزمایش با هدف بررسی اثر افزودن ویتامین E به جیره غذایی بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده در خروس‌های تحت تنش اکسیداتیو با دگزامتازون انجام شد. تعداد ۱۸ قطعه خروس گله مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در سن ۲۸ هفتگی به صورت طرح کاملا تصادفی با ۳ گروه آزمایشی و ۶ پرنده در هر گروه آزمایشی، انجام گرفت. گروه‌های آزمایشی شامل ۱- گروه کنترل (خروس‌های سالم تغذیه شده با جیره غذایی پایه) ۲- خروس‌های تزریق شده با دگزامتازون به مقدار ۴ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن (دگزا) ۳- دگزا + ویتامین E (۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک)، بودند. پس از ۲ هفته دوره عادت پذیری و ۳ هفته بعد از اعمال گروه‌های آزمایشی، نمونه‌های منی خروس‌ها با استفاده از روش ماساژ شکمی جمع‌آوری شد. خصوصیات کیفی اسپرم شامل میزان زنده‌مانی، درصد تحرک کل و پیش‌رونده، یک‌پارچگی غشای پلاسمایی و نیز میزان مالون دی‌آلدهید، ظرفیت آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تزریق دگزامتازون به عنوان عامل ایجادکننده تنش اکسیداتیو، به ترتیب سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی (۹/۱۱) و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی (۱/۰۱) پلاسمای اسپرم در مقایسه با گروه کنترل (۶/۹۴ و ۱/۱۶) گردید و از طرفی، تحرک کل (۴۹/۱۶)، تحرک پیش‌رونده (۱۲/۴۶)، درصد زنده‌مانی (۵۰/۸۴) و یک‌پارچگی غشای پلاسمایی (۵۰/۲۶) را شدیدا کاهش داد. افزودن ویتامین E به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم به جیره غذایی خروس های تزریق شده با دگزامتازون سبب بهبود تحرک کل (۷۳/۶۳)، درصد زنده‌مانی (۷۴/۱۲)، یک‌پارچگی غشای پلاسمایی (۷۲/۷۴)، ظرفیت آنتی اکسیدانی (۱/۵۰) و فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز (۷۳/۵۸)، سوپراکسید دیسموتاز (۱۴۴/۹۵) و کاهش میزان مالون دی‌آلدهید (۴/۶۱) در مقایسه با دو گروه دیگر شد. میزان تحرک پیش‌رونده در گروه کنترل (۲۶/۳۳) در مقایسه با دو گروه دیگر بیش‌ترین مقدار بود و فرکانس حرکات جانبی سر (۱۶/۰۸) در تنها گروه دگزامتازون بیشتر از دیگر گروه‌های آزمایشی بود. می‌توان نتیجه گرفت که تزریق دگزامتازون سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی شده و کیفیت اسپرم را کاهش می‌دهد. افزودن ویتامین E به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم به جیره خروس‌های مادر در شرایط تنش سبب بهبود کیفیت اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده، تنش‌اکسیداتیو، خروس، ویتامین E

## مقدمه

طیور تجاری با دامنه وسیعی از تنش‌ها مواجه می‌باشد و استرس

۱- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، ایران.
۲- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email:znemati@tabrizu.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.2021.68725.1007

اکسیداتیو دستگاه گوارش آنها از عوامل تغذیه ای، تنش گرمایی محیطی و عوامل پاتولوییکی حاصل می شود که می تواند عملکرد کلی و کیفیت گوشت و تخم را تغییر می دهد ( Mishra and Jha, 2019; Nemati *et al.*, 2014a; Nemati *et al.*, 2015; Nemati *et al.*, 2014b)بنابراین تنش اکسیداتیو برای پرورش‌دهندگان در صنعت طیور از اهمیت زیادی برخوردار است (Surai *et al.*, 2019). تنش اکسیداتیو عموما به عنوان یک عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در سطح سلولی و فردی تعریف می‌شود، به‌گونه‌ای که آسیب اکسیداتیو یکی از نتایج این عدم تعادل است که شامل تعدیل اکسیداتیو ماکرو مولکول‌های سلولی، مرگ سلولی توسط نکروز و آپوپتوز و نیز آسیب ساختاری بافت است که این روند در نهایت باعث کاهش عملکرد و ایجاد انواع بیماری‌ها و حتی سبب مرگ و میر می‌شود (Min *et al.*, 2018). انواع تنش‌های محیطی، تکنولوژیکی، تغذیه‌ای و بیولوژیکی مسئول کاهش بهره‌وری و عملکرد تولیدمثلی در طیور هستند که اکثر تنش‌ها در سطح مولکولی، با تنش اکسیداتیو و آسیب به مولکول‌های بیولوژیکی مهم، مرتبط می‌باشند (Ahmadian *et al.*, 2019; Surai *et al.*, 2019).  مصرف خوراک، کیفیت اسپرم، سطح تستوسترون، پراکسیداسیون لیپید پلاسمایی و دیگر صفات مهم، تحت تأثیر تنش اکسیداتیو شدید قرار دارند ( Khan *et al.*, 2011).

بخش مهمی از موفقیت در تولید گله مادر، نتیجه عملکرد تولیدمثلی خروس‌های گله است، چرا که آن‌ها نقش حداکثری در تولید تخم مرغ‌های بارور بازی می‌کنند (Asl *et al.*, 2018). فراسنجه‌های منی و عملکرد تولیدمثلی تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی از قبیل سن پرنده، تغذیه، تنش-های محیطی و افزایش وزن پرنده قرار می‌گیرد (Bazyar *et al.*, 2019). نتایج آزمایشات مختلف درباره‌ی خصوصیات اسپرم طیور و میزان باروری آن پس از نگه‌داری طولانی مدت، به دلیل تفاوت در مدت زمان نگه‌داری ( بین ۶ الی ۴۸ ساعت)، شیوه تلقیح مصنوعی و روش آنالیز میزان باروری، متفاوت می‌باشد اما عقیده بر این است که نگه‌داری اسپرم رقیق‌شده بیش از ۶ ساعت، موجب کاهش نرخ باروری می‌شود، این کاهش باروری پس از ۲۴ ساعت به حداکثر میزان خود می‌رسد (Donoghue and Wishart, 2000). از عوامل مهم در قابلیت باروری اسپرم، لیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم می‌باشد که ترکیب اسید چرب آن ویژگی‌های حیاتی تحرک، حساسیت به سرما و زنده‌مانی را تعیین می‌کند ( Hammerstedt *et al.*, 1990). لیپیدهای غشای اسپرم به شدت نسبت به اکسیداسیون حساس می‌باشد. اکسیداسیون اسیدهای چرب منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌شود که این رادیکال‌ها در شرایط نرمال جهت برخی فعالیت‌ها و فرآیندهای فیزیولوژیکی اسپرم ضروری بوده اما تولید بیش از حد ROS ها در اسپرم موجب کاهش سیالیت غشاء، شکست DNA، آسیب پروتئین‌ها و نهایتاً کاهش تحرک و باروری اسپرم‌ها می‌شود (Mahfouz *et al.*, 2010; Sanocka and Kurpisz, 2004).

مایع منی پرندگان حاوی سیستم آنتی‌اکسیدانی پیشرفته‌ای بوده که شامل آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی نظیر ویتامین‌های C، E، گلوتاتیون و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد (Surai *et al.*, 1998b) . حفظ تعادل بین تولید ROS و سیستم آنتی‌اکسیدانی جهت حفظ زنده‌مانی اسپرم، ضروری بوده که با نگه‌داری و انجماد اسپرم این تعادل بر هم می‌خورد ( Bréque *et al.*, 2003). جهت جلوگیری از افزایش اکسیداسیون لیپیدهای اسپرم و افزایش مدت زمان نگه‌داری اسپرم در محیط آزمایشگاه، استفاده از آنتی-اکسیدان‌های طبیعی در محیط رقیق‌کننده اسپرم ضروری به نظر می‌رسد. امروزه افزودنی‌های غذایی طبیعی برای بهبود عملکرد تولیدی و افزایش وضعیت سلامت گله خصوصا در گله‌هایی که تحت شرایط تنش گرمایی نگه‌داری می‌شوند، مورد توجه پرورش‌دهندگان طیور است ( Fathi *et al.*, 2020). از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موثر در دفاع آنتی-اکسیدانی بدن طیور و جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدهای اسپرماتوزوآ می-توان به ویتامین E اشاره کرد (Surai *et al.*, 2019) که می‌تواند در محافظت غشای سلول‌ها در مقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و از فرایندهای التهابی به وسیله تنظیم سیگنال‌های سلولی جهت کنترل ترجمه و تحریک سیستم ایمنی نقش بازی کند ( Ahsan *et al.*, 2014). ویتامین E یک آنتی‌اکسیدان لیپیدی است و رادیکال‌های آزاد را در غشاء سلول و ارگان‌های داخل سلولی جمع‌آوری می‌کند. بصورت کامل مشخص گردیده که افزودن مناسب ویتامین E به کاهش مواد واکنش‌دهنده اسید تیوباربیتوریک (TBARS) کمک می‌کند و موجب بهبود عملکرد رشد، پراکسیداسیون بافت و استحکام گوشت می-شود(Nemati *et al.*, 2020a; Nemati *et al.*, 2020b) و نیز اثرات ایمنی سلولی (Ahmadian *et al.*, 2020) و ایمنی هورمونی را تنظیم می‌کند. همچنین گزارش شده ویتامین E طبیعی نسبت به فرم مصنوعی آن بهتر است و آلفاتوکوفرول سطوح ظرفیت کلی آنتی‌اکسیدان (TAC) را افزایش داده و غلظت مالون دی آلدهید (MDA) را در کبد کاهش می‌دهد. در پژوهشی گزارش کردند که افزودن ویتامین E به تنهایی و یا همراه با ویتامین c در جیره غذایی خروس گله مادر نژاد لویانگ در سن ۴۵ هفتگی  به ترتیب به میزان ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم سبب جلوگیری از اثرات منفی تنش اکسیداتیو بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پاسخ ایمنی خروس‌ها می‌شود (Min *et al.*, 2018). مصرف مقادیر بالای ویتامین E (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم رژیم غذایی)، غلظت آن را در خون و پلاسمای منی افزایش می‌دهد و باعث ایجاد تغییرات مفیدی در ظرفیت آنتی اکسیدانی و مشخصات لیپید مایع منی خروس در شرایط عادی می‌شود (Surai *et al.*, 1997b). نتایج آزمایشات نشان داده‌اند که ویتامین E می‌تواند کیفیت اسپرم پس از ذوب را در گاوها ( Towhidi and Parks, 2012)، قوچ‌ها (Silva *et al.*, 2013) و خروس‌ها بهبود بخشد ( Amini *et al.*, 2015a; Moghbeli *et al.*, 2016). گلوکوکورتیکوئیدها، استرس فیزیولوژیک را افزایش داده و سبب ایجاد استرس فیزیولوژیک در بافت‌ها و جریان خون می‌گردند ( Costantini *et al.*, 2011; Eid *et al.*, 2008; Virden *et al.*, 2007). در مطالعه‌ای، با تزریق دگزامتازون به خروسها و ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو پاسخ ایمنی خروسها  تمایل به کاهش داشته و با ادامه یافتن استرس اکسیداتیو به واسطه تزریق

دگزامتازون، آسیب‌های اکسیداتیو به بیومولکول‌های حیاتی مانند ژنوم وارد آمده و برآیند این آسیب‌ها منجر به برخی اثرات بیولوژیک مانند تغییر در بیان ژن، جهش و مرگ سلولی می‌گردد (Min *et al.*, 2018). بنابراین با توجه به اینکه عملکرد تولید مثلی خروس‌ها در شرایط تنش اکسیداتیو کاهش می‌یابد، این پژوهش با هدف بررسی اثر افزودن ویتامین E به جیره غذایی بر کیفیت اسپرم منجمد- یخ گشایی درخروس‌های تحت تنش-اکسیداتیو با استفاده از تزریق دگزامتازون، انجام شد.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق در سالن مرغداری دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تبریز با ۱۸ قطعه خروس سویه راس ۳۰۸ در سن ۲۸ هفتگی در ۳ گروه آزمایشی و ۶ پرنده در هر گروه بصورت طرح کاملاً تصادفی انجام شد. سالن مجهز به سیستم پرورش در قفس انفرادی، آبخوری نیپلی و غذادهی دستی بود و همه گروه‌های آزمایشی با دو نوبت غذادهی بر اساس کاتالوگ سویه راس۳۰۸ (جدول۱) و دسترسی آزاد به آب، با برنامه نوردهی ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گروه‌های آزمایشی شامل ۱- گروه شاهد (خروس‌های سالم تغذیه شده با جیره غذایی پایه) ۲-گروه دگزا (خروس‌های دریافت کننده تزریق زیر پوستی دگزامتازون به میزان ۴ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن)، ۳- گروه دگزا + ویتامین E به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم درکیلوگرم خوراک، بودند. خروس ها به مدت ۲ هفته با شرایط محیطی و قفس و روس ماساژ شکمی اسپرم گیری عادت‌دهی شدند، سپس به مدت یک هفته تزریق دگزامتازون دریافت کردند. آزمایش بعد از هفته تزریق و ایجاد تنش اکسیداتیو با افزودن ویتامین E به جیره غذایی آغاز گردید.

**جدول ۱**- جیره غذایی خروس مادر راس ۳۰۸ در دوره آزمایش

**Table 1**- Ross 308 male broiler breeder diet in experimental period.

| مواد خوراکی<br>Ingredien | مقدار (٪)<br>Content (%) | ترکیب شیمیایی<br>Chemical composition | |
|---|---|---|---|
| ذرت<br>Corn | 57 | انرژی قابل متابولیسم<br>Metabolism Energy | 2750 kcal / kg |
| کنجاله سویا (پروتئین خام= ۴۴)<br>Soybean meal (Cp=44) | 10 | پروتئین خام<br>Crude protein | 12% |
| جو<br>Barley | 11 | متیونین-سیستئین<br>Methionine -Cysteine | 0.45% |
| سبوس گندم<br>Wheat bran | 18 | لایزین<br>Lysine | 0.5% |
| دی کلسیم فسفات<br>Dicalcium phosphate | 1.3 | ترئونین<br>Threonine | 0.38% |
| پوسته صدف<br>Oyster shell | 1.6 | کلسیم<br>Calcium | 0.7% |
| مکمل ویتامین معدنی<br>Mineral vitamin supplement | 0.5 | فسفر<br>Phosphorus | 0.35% |
| نمک<br>Salt | 0.3 | سدیم<br>Sodium | 0.18% |
| سدیم بیکربنات<br>Sodium bicarbonate | 0.05 | کلر<br>Chlorine | 0.16% |
| دی- ال- متیونین<br>DL-methionine | 0.11 | لینولئیک اسید<br>Linoleic acid | 1% |
| ویتامین ب<br>Vitamin B | 0.01 | | |
| ویتامین ای<br>Vitamin E | 0.01 | | |
| کولین کلراید<br>Choline chloride | 0.01 | | |

دگزامتازون مورد نیاز از شرکت دارویی ابوریحان تهیه شد و بصورت زیرجلدی در سه نوبت به‌صورت یک روز در میان به میزان ۴ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن، در سه نوبت به‌صورت یک روز در میان و به مدت ۱ هفته تزریق شد (Min *et al.*, 2018). گروههای آزمایشی شاهد و شاهد با دگزا جیره پایه را دریافت کردند. گروه آزمایشی سوم جیره غذایی پایه + ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین E مکمل دریافت کرد. مدت ۳ هفته پس از اعمال تیمارهای آزمایشی، اسپرم‌گیری از خروس‌ها با استفاده از روش ماساژ شکمی ۲ بار در هفته و به مدت ۳ هفته انجام

گرفت (Burrows and Quinn, 1937). نمونه‌های منی هر خروس داخل میکروتیوب جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار داده شدند تا ارزیابی اولیه از نظر تحرک، غلظت و رنگ اسپرم انجام شود. اسپرم‌های با تحرک ۷۵ درصد و غلظت مناسب به عنوان اسپرم‌های طبیعی در نظر گرفته شده و برای مراحل بعدی آزمایش، برای از بین بردن اثرات فردی، نمونه‌ها با هم مخلوط شدند. محیط رقیق‌کننده مورد استفاده، بلتسویل بهبود یافته بود که تمامی محصولات آن از شرکت مرک آلمان تهیه شده بود و شامل دی فسفات (۱۲/۷ گرم در لیتر)، سدیم گلوتامات (۸/۶۱ گرم در لیتر)، فروکتوز (۵ گرم در لیتر)، سدیم استات (۴/۳ گرم در لیتر)، تریس (۱/۹ گرم در لیتر)، پتاسیم سیترات (۰/۶۴ گرم در لیتر)، پتاسیم مونو فسفات (۰/۶۵ گرم در لیتر)، کلراید منیزیم (۰/۳۴ گرم در لیتر) بود (Nabi et al., 2016).

نمونه‌های منی که به منظور حذف اثرات فردی مخلوط شده بودند، به نسبت حجمی ۱ به ۲۰ به محیط رقیق‌کننده افزوده و درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، انتقال داده شدند. پس از ۲ ساعت و رسیدن دمای نمونه‌ها به ۴ درجه سانتی‌گراد، رقیق کننده با اسپرم مخلوط گردید تا به غلظت $۳۰۰×۱۰^۶$ برسد و سپس به داخل پایوت‌ها انتقال و با خمیر مهر و موم شدند (Nasri et al., 2014). پایوت‌های دارای اسپرم، در ارتفاع ۵-۴ سانتی‌متر بالای بخار ازت به مدت ۷ دقیقه قرار داده شدند و سپس برای ذخیره‌سازی به داخل تانک ازت (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) انتقال داده شدند تا فرایند انجماد اسپرم‌ها تکمیل گردد (Amini et al., 2015b). برای بررسی فراسنجه‌های کیفی اسپرم گروه‌های مختلف آزمایشی، پایوت‌های حاوی اسپرم منجمد، از ازت مایع خارج شدند و پس از قراردادن در حمام آب گرم دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، یخ‌گشایی شده و به داخل میکروتیوپ تخلیه شدند تا ارزیابی‌های مورد نظر انجام شود (Amini et al., 2015b).

تحرک کل (TM)، تحرک پیش‌رونده (PM)، میانگین سرعت در مسیر (VAP)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL)، سرعت در مسیر منحنی (VCL)، خطی بودن تحرک (LIN)، درصد مستقیم الخط بودن حرکت اسپرم‌ها (STR)، تحرک عرضی سر (ALH)، فرکانس حرکات جانبی (BCF)، توسط سیستم آنالیز رایانه‌ای مجهز به میکروسکوپ فاز کنتراست (Labomed LX400, USA) با بزرگنمایی ۱۰۰ و نرم افزار انالیز اسپرم ارزیابی شد (Safa et al., 2016). بدین منظور سه پایوت از هر گروه آزمایشی با روشی که در بالا توضیح داده شد، یخ‌گشایی شده و به داخل میکروتیوب‌ها انتقال داده شد، سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی رقیق‌شده را روی لام ریخته و یک لامل تمیز روی آن قرار داده شد و فرآسنجه‌های جنبایی اسپرم با استفاده از کامپیوتر ارزیابی شد (da Silva Maia et al., 2009).

ارزیابی فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم بر اساس تست هایپواسموتیک (HOST) حاوی فروکتوز (۹ گرم) و سیترات سدیم (۴/۹ گرم)، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول در محیط اسپرم طراحی شد (Shahverdi et al., 2015). اسپرم‌های با دم گره خورده به عنوان اسپرم‌های دارای غشاء یک‌پارچه و اسپرم‌های که دم آن‌ها صاف بود به عنوان اسپرم داری غشاء غیر یک‌پارچه تلقی شد (Revell and Mrode, 1994). برای این منظور مقدار ۱۰ میکرولیتر اسپرم رقیق‌شده را با ۲۰۰ میکرولیتر محلول هاست مخلوط شد (Nabi et al., 2016; Najafi et al., 2019; Shahverdi et al., 2015) وضعیت اسپرم‌های با دم صاف و دم پیچیده زیر میکروسکوپ (Olympus, Japan) با بزرگنمایی ×۴۰۰ مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها بوسیله رنگ آمیزی ائوزین- نگروزین بررسی شد. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر منی رقیق‌شده را با ۲۰ میکرولیتر رنگ حاوی رنگ ائوزین (۱/۶۷ گرم)، رنگ نیگروزین (۱۰ گرم) و سیترات سدیم (۲/۹ گرم) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کرده و گسترشی بر روی لام تهیه شد و زنده‌مانی تعداد ۲۰۰ اسپرم بوسیله میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) با بزرگنمای ×۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌هایی که بطور کلی یا جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش بخود گرفته بودند را مرده و اسپرم‌هایی که رنگ نگرفته بودند، اسپرم‌های زنده در نظر گرفته شد (Evans and Maxwell, 1987).

برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، مقدار یک میلی‌لیتر از منی رقیق‌شده با یک میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد مخلوط شده و سپس نمونه‌ها با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و به تعداد سه بار با بافر سیترات شستشو و مجدداً سانتریفیوژ شدند. در نهایت محلول رویی دور ریخته شده و رسوب باقیمانده اسپرم‌ها در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده و تا زمان انجام تست، نمونه‌ها در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را برداشته و با یک میلی‌لیتر محلول تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد برای رسوب پروتئین مخلوط شد. بخش بالایی از طریق سانتریفیوژ کردن جدا و با یک میلی لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد (شرکت سیگما، آمریکا) مخلوط شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها بعد از سرد شدن در داخل یخ، بمدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریقیوژ شدند. در پایان عدد جذب مالون دی آلدئید محلول بالایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل، JENWAY – 6405) در طول موج ۵۸۶ نانومتر خوانده شد (Peris et al., 2007).

فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پلاسمای اسپرم مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده توسط کیت‌های تجاری شرکت طب پژوهان (ایران- تهران) انجام شد. بطور خلاصه برای اندازه گیری فعالیت سوپراکسید

دیسموتاز، مقدار ۱۰ میکرولیتر نمونه با مقادیر توصیه شده محلول آماده کیت مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه شیک شد سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۰ دقیقه انکوباسیون و عدد جذبی در طول موج ۴۶۰-۴۴۰ رکورد شد. مطابق دستورالعمل کیت آزمون فعالیت سوپراکسید دیسموتاز از لحاظ دقت برای ۸ تکرار نمونه در سه روز متفاوت، ضریب تغییرات درون و بین تستی به ترتیب ۸ و ۷ درصد بود.

## تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده از این آزمایش توسط رویه‌ی GLM نرم افزار SAS و در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسات میانگین گروه‌ها با آزمون دانکن انجام شده و نتایج به صورت میانگین مربعات خطا در سطح ۵ درصد (P <۰/۰۵) گزارش گردید.

رابطه ۱: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$

که در این مدل، $Y_{ij}$= مقدار عملکرد صفت وابسته‌ی نمونه‌ی j ام در گروه i ام، μ= میانگین کل گروه، $T_i$= اثر گروه و $e_{ij}$= اثرات باقیمانده، هستند.

## نتایج و بحث

بررسی داده‌های مربوط به تحرک و فراسنجه‌های حرکتی نشان می‌دهد که تزریق دگزامتازون به عنوان عامل ایجاد تنش اکسیداتیو سبب کاهش شدید تحرک کل در مقایسه با گروه کنترل شده است (P<۰/۰۵). اما افزودن مکمل ویتامین E به جیره غذایی خروس‌ها در شرایط تنش اکسیداتیو سبب بهبود شاخص تحرک کل در مقایسه با دو گروه دیگر شد (P<۰/۰۵) (جدول ۲). همچنین تزریق دگزامتازون سبب کاهش در تحرک پیش‌رونده در مقایسه با گروه کنترل شد و استفاده از ویتامین E توانست تا حد زیادی تأثیر منفی دگزامتازون بر تحرک پیش-رونده را جبران کند هر چند میانگین حرکت پیش‌رونده در مقایسه با گروه کنترل کمتر و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) که این نتایج، با یافته پژوهش دیگری که نشان دادند، افزودن ویتامین E به جیره غذایی انسان، بر قدرت تحرک و به ویژه حرکت پیش‌رونده اسپرم مؤثر است، موافقت دارد (Lenzi *et al.*, 1996). نتایج مشابه تحرک پیش‌رونده برای صفات سرعت منحنی (VCL) و تحرک عرضی سر (ALH ) مشاهده شد و با تزریق دگزامتازون سرعت منحنی و تحرک عرضی سر کاهش و با افزودن ویتامین E به جیره غذایی خروس‌ها میانگین این صفات افزایش یافت. همچنین فراسنجه‌های حرکتی VAP و VSL در گروه دگزا کاهش و با دریافت ویتامین E میانگین آنها افزایش یافت (P<۰/۰۵). صفات خطی بودن تحرک (LIN) و مستقیم الخط بودن اسپرم‌ها (STR) تحت تاثیر گروه‌ها قرار نگرفت. نتایج آزمایش نشان می‌دهد اکثر صفات حرکتی اسپرم در شرایط تنشی کاهش یافته و میانگین این صفات در اسپرم خروس‌های دریافت‌کننده جیره غذایی حاوی ویتامین بهبود یافته است. رادیکال-های آزاد بویژه انواع گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن موجب مهار آنزیم-های درون‌سلولی می‌شوند و بدین ترتیب اسپرم‌ها از منابع آنزیمی دخیل در تأمین ATP مورد نیاز جهت تحرک و فعالیت محروم شدند (De Lamirande and Ggnon, 1992). اسپرم فاقد سیستم آنزیمی سیتوپلاسمی لازم برای ترمیم ضایعهٔ ناشی از میزان بالای گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن می‌باشد که اسپرم را در برابر تنش اکسیداتیو ناتوان می‌کند (Saleh *et al.*, 2002). افزودن ویتامین E به عنوان آنتی اکسیدان در جیره خروس‌های تحت تنش اکسیداتیو، سبب شده است تا تحرک کل در مقایسه با دو گروه کنترل و دگزامتازون، حفظ شود. در واقع آنتی اکسیدان با تجزیه آنیون‌های سوپراکسید، از ایجاد آسیب به غشاء اسپرم و کاهش فرآسنجه‌های آن جلوگیری می‌کند. ویتامین E بعنوان ترکیب اصلی سیستم آنتی اکسیدانی در اسپرماتوزوآ می‌باشد (Lenzi *et al.*, 1996). در طرف مقابل رادیکال‌های آزاد، آنتی اکسیدان‌ها وجود دارند که تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپید را کنترل می‌کنند (Türk *et al.*, 2008). ویتامین E تأثیر نگه‌دارنده در میزان قدرت تحرک دارد و بگونه‌ای سبب حفظ تحرک می‌شود (Kheradmand *et al.*, 2006). مطابق با نتایج حاصل از آزمایش حاضر، در آزمایشی مشابه، گزارش کردند که تزریق ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دگزامتازون سبب کاهش در تحرک کل شده و استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک ویتامین E سبب بهبود تحرک کل در مقایسه با گروه کنترل و دریافت‌کننده دگزامتازون شد (Eid *et al.*, 2006). هنگامی که میزان ویتامین ویتامین E به اندازه برابر ۵۰۰ برابر میزان پیشنهادی NRC در جیره ( ۱۵۱ واحد بین المللی بر کیلوگرم جیره) اضافه می‌شود سبب افزایش کیفیت منی و توان باروری جوجه‌ها می‌شود (Tabatabaei *et al.*, 2011). مشابه با نتایج آزمایش حاضر، افزودن سطوح بالاتر ویتامین E به مدت ۴ هفته به جیره جوجه خروس‌های کامپونگ سبب بهبود فراسنجه‌های منی شد (Mohamad Asrol and Abdul Rashid, 2017). آزمایش انجام شده نشان‌دهنده بهبود تحرک اسپرم در رقیق‌کننده‌های حاوی ویتامین E بود (Donoghue and Donoghue, 1997). طی آزمایشی نشان داده شد که استفاده از ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آلفاتوکوفرول در رقیق‌کننده انجمادی اسپرم خوک، تحرک بدست آمده پس از ذوب را افزایش می‌دهد (Breininger *et al.*, 2005). ویتامین E تحرک اسپرم خوک را به طور معنی‌داری افزایش داد و از صدمات ناشی از انجماد اسپرم جلوگیری می‌کند (Breininger *et al.*, 2005). این نتایج نشان داد که ویتامین E از سلول‌های اسپرم در مرحله پس از ذوب انجماد محافظت می‌کند (Davies *et al.*, 1988).

میزان یک‌پارچگی غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم، در جدول ۳ آورده شده است. نتایج حاکی از آن است که، هر دو فراسنجه با تزریق

دگزامتازون، افت شدیدی داشته‌اند و اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). یکی از عوامل مهم در کاهش تحرک اسپرماتوزوآ، ممانعت از خسارت‌های ساختاری ناشی از فشارهای اکسیداتیو بر یکپارچگی غشاء می‌باشد که منجر به افزایش نفوذپذیری غشاء و کاهش توانایی تنظیم سطوح یونی در داخل سلول می‌شود، که مجموعه این شرایط برای تحرک اسپرم مضر می‌باشند (Baumber *et al.*, 2000).

**جدول۲**- اثرات افزودن مکمل ویتامین E بر تحرک و فرآسنجه‌های حرکتی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو.

**Table 2**- Effects of vitamin E supplementation on motility and motility parameters of frozen-thawed sperm of broiler breeder rooster under oxidative stress.

| پارامترها<br>Parameters[1] | تیمارها Treatments<br>شاهد<br>Control | <br>شاهد با دگزامتازون<br>Control with dexamethasone | <br>ویتامین E با دگزامتازون<br>Vitamin E with dexamethasone | SEM | P value |
|---|---|---|---|---|---|
| تحرک کل<br>TM (%) | 68.87[b] | 49.16[c] | 73.63[a] | 1.14 | <0.01 |
| تحرک پیشرونده<br>PM (%) | 26.33[a] | 12.46[c] | 20.46[b] | 1.07 | <0.01 |
| میانگین سرعت در مسیر<br>VAP (µm.s) | 19.08[a] | 11.99[b] | 15.04[b] | 1.23 | 0.01 |
| سرعت در مسیر مستقیم<br>VSL (µm.s) | 14.83[a] | 9.48[b] | 11.52[a] | 1.19 | 0.03 |
| سرعت در مسیر منحنی<br>VCL (µm.s) | 53.28[a] | 34.92[c] | 43.75[b] | 1.85 | <0.01 |
| خطی بودن تحرک<br>LIN (%) | 25.66 | 22.25 | 25.27 | 1.77 | 0.37 |
| درصد مستقیم الخط بودن حرکت اسپرم‌ها<br>STR (%) | 70.85 | 64.45 | 68.85 | 2.52 | 0.23 |
| جنبایی عرضی سر<br>ALH (µm) | 1.48[a] | 0.9[c] | 1.26[b] | 0.06 | 0.01 |
| فرکانس حرکات جانبی<br>BCF (Hz) | 14.19[b] | 16.08[a] | 14.68[b] | 0.29 | 0.01 |

[a,b] تیمارها با حروف متفاوت در هر سطر از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

[a,b] Different letters in the same row show statistically differences ($P < 0.05$).

[1] Tm (Total Motility), Pm (Progressive Motility), VAP (Average Path Velocity), VSL (Straight Line Velocity), VCL (Curvi Linear Velocity), LIN (Linearity), STR (Straightness), ALH (Lateral Head Displacement), BCF (Beat Cross Frequency).

گروه دریافت‌کننده دگزامتازون که با ویتامین E مکمل‌سازی شده بود، سبب افزایش در میزان زنده‌مانی و یک‌پارچگی غشای پلاسمایی در مقایسه با دو گروه دیگر شد. نتایج ما با نتایج آزمایش سایر محققین، مطابقت دارد که نشان دادند، استفاده از دگزامتازون به مقدار ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب افزایش درصد اسپرم‌های مرده می‌شود (Eid *et al.*, 2006). با توجه به غشای اسپرم که دارای مقدار زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد، مستعد پراکسیداسیون لیپید بوده و در صورت عدم استفاده از آنتی اکسیدان‌ها در محیط برون‌تنی دام احتمال اختلال و تخریب بسیار زیاد نمی‌باشد. افزودن ویتامین E در چنین محیطی سبب بهبود حفاظت از اسپرم و مانع اکسیداسیون شد (Amini *et al.*, 2015a). طی نگهداری سرمایی و در شرایط یخچال مقدار زنده‌مانی نمونه‌های اسپرم کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تأثیر رادیکال‌های آزاد بر ساختار غشاء باشد (Feyzi *et al.*, 2018).

تأثیر منفی تزریق دگزامتازون بر وضعیت آنتی اکسیدانی اسپرم در جدول ۴ نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد تزریق دگزامتازون سبب افزیش در تولید مالون دی آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی شده است که به دنبال آن نیز، افت شدیدی در ظرفیت کل آنتی اکسیدانی، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه دریافت-کننده دگزامتازون مشاهده شد (P<۰/۰۵). افزودن ویتامین E در جیره خروس‌های تنش‌دیده سبب بهبود فراسنجه‌های معرف وضعیت آنتی اکسیدانی شد که نشان‌دهنده تأثیر مثبت و آنتی اکسیدانی این ویتامین می‌باشد (P<۰/۰۵). از آنجا که ویتامین E در قسمت لیپید غشایی واقع شده است، جایی که روند پراکسیداسیون لیپیدی اتفاق می‌افتد، این ویتامین می‌تواند برای جلوگیری از تشکیل پراکسیداسیون لیپید غشایی عمل کند

و بنابراین، متغیرهای کیفیت اسپرم را تقویت می‌کند (Surai *et al.*, 2001). نتایج ما تأکید دارند که مکمل رژیم غذایی ویتامین E از بروز پراکسیداسیون لیپید اسپرم جلوگیری می‌کند که مطابق با نتایج سایر محققین می‌باشد (Asl *et al.*, 2018). در حقیقت، ویتامین E، مهم‌ترین آنتی اکسیدان محلول در چربی موجود در غشاهای سلولی است و نقش مهمی در شکست واکنش زنجیره‌ای پراکسیداسیون دارد. محققان نشان دادند که گلوتاتیون پراکسیداز و ویتامین E جزء اصلی سیستم آنتی اکسیدانی اسپرم خروس هستند (Surai *et al.*, 1998a; Surai *et al.*, 1997a). محققان نشان دادند که اسپرم از ۵ گونه مرغی، از جمله مرغ، همه با نسبت‌های بالای PUFA (اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر) مشخص می‌شوند. ایزوآنزیم‌های اصلی سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز، که در برابر پراکسیداسیون مرتبط با درجه بالایی از اشباع اسید چرب محافظت می‌کنند، در اسپرم از همه گونه فعال بودند. مصرف روزانه ۲۲۵ میکروگرم سلنیوم و ۴۰۰ میلی‌گرم در روز ویتامین E به صورت خوراکی به مدت سه ماه به طور معنی‌داری با کاهش سطح مالون دی آلدهید مایع منی، منجر به بهبود تحرک اسپرم در انسان شد (Keskes-Ammar *et al.*, 2003).

**جدول ۳**- اثرات افزودن مکمل ویتامین E بر یک‌پارچگی غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم منجمد-یخ گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو.

**Table 3**- Effects of vitamin E supplementation on plasma membrane integrity and viability of frozen-thawed sperm of broiler breeder rooster under oxidative stress.

| فراسنجه ها<br>Parameters | تیمارها Treatments<br>شاهد<br>control | <br>شاهد با دگزامتازون<br>Control with dexamethasone | <br>ویتامین E با دگزامتازون<br>Vitamin E with dexamethasone | SEM | P.value |
|---|---|---|---|---|---|
| یک‌پارچگی غشاء<br>Membrane Integrity (%) | $58.50^{b}$ | $50.26^{c}$ | $72.74^{a}$ | 1.27 | <0.01 |
| زنده‌مانی<br>Viability (%) | $63.68^{b}$ | $50.84^{c}$ | $74.12^{a}$ | 1.34 | <0.01 |

[a,b] تیمارها با حروف متفاوت در هر سطر از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

[a,b] Different letters in the same row show statistically differences ($P < 0.05$).

**جدول٤**- اثرات افزودن مکمل ویتامین E بر فرآسنجه‌های بیوشیمیایی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو.

**Table 4**- Effects of vitamin E supplementation on biochemical parameters of frozen-thawed sperm of broiler breeder rooster under oxidative stress.

| فراسنجه ها<br>Parameters[1] | تیمارها Treatments<br>شاهد<br>Control | <br>شاهد با دگزامتازون<br>Control with dexamethasone | <br>ویتامین E با دگزامتازون<br>Vitamin E with dexamethasone | SEM | P.value |
|---|---|---|---|---|---|
| مالون دی آلدهید<br>[2]MDA (nmol/ ml) | $6.94^{b}$ | $9.11^{a}$ | $4.61^{c}$ | 0.29 | <0.01 |
| ظرفیت کل آنتی اکسیدانی<br>TAC(U/ml) | $1.16^{b}$ | $1.01^{c}$ | $1.50^{a}$ | 0.03 | <0.01 |
| گلوتاتیون پراکسیداز<br>GPx(U/ml) | $55.69^{b}$ | $46.16^{c}$ | $73.58^{a}$ | 1.91 | <0.01 |
| سوپراکسیددیسموتاز<br>SOD(U/ml) | $111.72^{b}$ | $103.45^{c}$ | $144.95^{a}$ | 2.47 | <0.01 |

[a,b] تیمارها با حروف متفاوت در هر سطر از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

[a,b] Different letters in the same row show statistically differences ($P < 0.05$).

[1] MDA (malondialdehyde), TAC (Total Antioxidant Capacity), GPx (glutathione per-oxidase), SOD (Superoxide Dismutase).

## نتیجه گیری

تزریق دگزامتازون و القاء تنش اکسیداتیو سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم‌ها و کاهش کیفیت اسپرم می‌شود. افزودن ویتامین E به جیره خروس‌های مادر در شرایط تنش اکسیداتیو سبب بهبود اثرات منفی شرایط اکسیداتیو القاء شده با دگزامتازون بر کیفیت اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده خروس‌های گله مادر گوشتی می‌گردد بنابراین افزودن مکمل ویتامین E در جیره غذایی خروس‌های مرغ مادر

گوشتی در شرایط تنش توصیه می‌شود.

## Refrences


1. Ahmadian, H., Z. Nemati, A. Karimi, and R. Safari. 2019. Effect of different dietary selenium sources and storage temperature on enhancing the shelf life of quail eggs. Animal Production Research 8 (2): 23-33.
2. Ahmadian, H., Z. Nemati, A. Karimi, R. Safari, M. Sheikhloo, and M. Besharati. 2020. Effect of Selenium with Vitamin E on Production Performance, Immune Response and Blood Metabolites of Laying Japanese Quail. Iranian Journal of Animal Science Research 12: 337-349.
3. Ahsan, U., Z. Kamran, I. Raza, S. Ahmad, W. Babar, M. Riaz, and Z. Iqbal. 2014. Role of selenium in male reproduction—A review. Animal reproduction science 146: 55-62. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.009.
4. Amini, M. R., H. Kohram, A. Z. Shahaneh, M. Zhandi, H. Sharideh, and M. M. Nabi. 2015a. The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cell tissue banking 16: 587-592. https://doi.org/10.1007/s10561-015-9506-9.
5. Amini, M. R., H. Kohram, A. Zare-Shahaneh, M. Zhandi, H. Sharideh, and M. M. Nabi. 2015b. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cryobiology 70: 226-232. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.03.001
6. Asl, R. S., F. Shariatmadari, M. Sharafi, M. A. K. Torshizi, and A. Shahverdi. 2018. Dietary fish oil supplemented with vitamin E improves quality indicators of rooster cold-stored semen through reducing lipid peroxidation. Cryobiology 84: 15-19. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.08.008.
7. Baumber, J., B. A. Ball, C. G. GRAVANCE, V. Medina, and M. C. DAVIES-MOREL. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. Journal of andrology 21: 895-902.
8. Bazyar, M., M. Sharafi, and A. Shahverdi. 2019. Changes in seminal parameters and hormonal profile with use of aromatase inhibitor in management of aging broiler breeder roosters. Poultry science 98: 6100-6107. https://doi.org/10.3382/ps/pez325.
9. Breininger, E., N. B. Beorlegui, C. M. O'Flaherty, and M. T. Beconi. 2005. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. Theriogenology 63: 2126-2135. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.016.
10. Bréque, C., P. Surai, and J. P. Brillard. 2003. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. Molecular Reproduction Development: Incorporating Gamete Research 66: 314-323. https://doi.org/10.1002/mrd.10347.
11. Burrows, W., and J. Quinn. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Science 16: 19-24. https://doi.org/10.3382/ps.0160019.
12. Costantini, D., V. Marasco, and A. P. Møller. 2011. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. Journal of Comparative Physiology B 181: 447-456. https://doi.org/10.1007/s00360-011-0566-2.
13. da Silva Maia, M., S. D. Bicudo, H. C. Azevedo, C. C. Sicherle, D. B. de Sousa, and L. Rodello. 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. Small Ruminant Research 85: 85-90. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.07.001.
14. Davies, M. J., L. G. Forni, and R. L. Willson. 1988. Vitamin E analogue Trolox CEsr and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions. Biochemical Journal 255: 513.
15. De Lamirande, E., and C. Ggnon. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. Journal of andrology 13: 368-378.
16. Donoghue, A., and D. Donoghue. 1997. Effects of water-and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. Poultry Science 76: 1440-1445. https://doi.org/10.1093/ps/76.10.1440.
17. Donoghue, A. M., and G. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. Animal reproduction science 62: 213-232. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00160-3.
18. Eid, Y., T. Ebeid, M. Moawad, and M. El-Habbak. 2008. Reduction of dexamethasone-induced oxidative stress and lipid peroxidation in laying hens by dietary vitamin E supplementation. Emirates Journal of Food Agriculture: 28-40. https://doi.org/10.9755/ejfa.v20i2.5188.
19. Eid, Y., T. Ebeid, and H. Younis. 2006. Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. British poultry science 47: 350-356. https://doi.org/10.1080/00071660600753912.
20. Evans, G., and W. C. Maxwell. 1987. Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Butterworths.
21. Fathi, M., I. Al-Homidan, T. Ebeid, O. Abou-Emera, and M. Mostafa. 2020. Dietary supplementation of Eucalyptus leaves enhances eggshell quality and immune response in two varieties of Japanese quails under tropical condition.

Poultry Science 99: 879-885. https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.09.001.
22. Feyzi, S., M. Sharafi, and S. Rahimi. 2018. Stress preconditioning of rooster semen before cryopreservation improves fertility potential of thawed sperm. Poultry science 97: 2582-2590.
23. Hammerstedt, R. H., J. K. Graham, and J. P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. Journal of andrology 11: 73-88.
24. Keskes-Ammar, L. et al. 2003. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. Archives of andrology 49: 83-94. https://doi.org/10.1080/01485010390129269.
25. Khan, R. U., S. Naz, Z. Nikousefat, V. Tufarelli, M. Javdani, N. Rana, and V. Laudadio. 2011. Effect of vitamin E in heat-stressed poultry. World's poultry science journal 67: 469-478.
26. Kheradmand, A., H. Babael, and J. Abshenas. 2006. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen.
27. Lenzi, A., M. Picardo, L. Gandini, and F. Dondero. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. Human reproduction update 2: 246-256. https://doi.org/10.1093/humupd/2.3.246.
28. Mahfouz, R., R. Sharma, A. Thiyagarajan, V. Kale, S. Gupta, E. Sabanegh, and A. Agarwal. 2010. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. Fertility sterility 94: 2141-2146.
29. Min, Y., Z. Niu, T. Sun, Z. Wang, P. Jiao, B. Zi, P. Chen, D. Tian, and F. Liu. 2018. Vitamin E and vitamin C supplementation improves antioxidant status and immune function in oxidative-stressed breeder roosters by up-regulating expression of GSH-Px gene. Poultry science 97: 1238-1244.
30. Mishra, B., and R. Jha. 2019. Oxidative stress in the poultry gut: Potential challenges and interventions. Frontiers in veterinary science 6: 60.
31. Moghbeli, M., H. Kohram, A. Zare-Shahaneh, M. Zhandi, M. Sharafi, M. M. Nabi, V. Zahedi, and H. Sharideh. 2016. Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration? Cryobiology 72: 264-268. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.008.
32. Mohamad Asrol, K., and B. Abdul Rashid. 2017. Effect of vitamin E supplementation on semen quantity and quality of Local Kampong roosters. Malaysian Journal of Animal Science 20: 37-43.
33. Nabi, M. M., H. Kohram, M. Zhandi, H. Mehrabani-Yeganeh, H. Sharideh, A. Zare-Shahaneh, and V. Esmaili. 2016. Comparative evaluation of Nabi and Beltsville extenders for cryopreservation of rooster semen. Cryobiology 72: 47-52.
34. Najafi, A., R. A. Taheri, M. Mehdipour, F. Martínez-Pastor, A. A. Rouhollahi, and M. R. Nourani. 2019. Improvement of post-thawed sperm quality in broiler breeder roosters by ellagic acid-loaded liposomes. Poultry science 98: 440-446. https://doi.org/10.3382/ps/pey353.
35. Nasri, S., F. Amidi, and Z. Rezaeian. 2014. Effect of Selenium on the motility, morphology and viability of sperm cells after freezing and thawing procedure. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences 18: 11-17.
36. Nemati, Z., H. Ahmadian, M. Besharati, S. Lesson, K. Alirezalu, R. Domínguez, and J. M. J. F. Lorenzo. 2020a. Assessment of dietary selenium and vitamin E on laying performance and quality parameters of fresh and stored eggs in Japanese Quails. 9: 1324.
37. Nemati, Z., K. Alirezalu, M. Besharati, S. Amirdahri, D. Franco, and J. M. J. F. Lorenzo. 2020b. Improving the quality characteristics and shelf life of meat and growth performance in goose fed diets supplemented with vitamin E. 9: 798. https://doi.org/10.3390/foods9060798.
38. Nemati, Z., H. Janmohammadi, A. Taghizadeh, G. Moghaddam, and H. Maleki Nejad. 2014a. Effect of bentonite supplementation to the contaminated diets with aflatoxin B1 on broiler performance. In: 6th Iranian congress on animal science, Tabriz
39. Nemati, Z., H. Janmohammadi, A. Taghizadeh, H. M. Nejad, and G. Mogaddam. 2015. Effect of Bentonite as a natural adsorbent to ameliorate the adverse effects of aflatoxin B1 on performance and immune systems in broiler chicks. Animal Production Research 4.
40. Nemati, Z., H. Janmohammadi, A. Taghizadeh, H. M. Nejad, G. Mogaddam, and M. Arzanlou. 2014b. Occurrence of Aflatoxins in poultry feed and feed ingredients from northwestern Iran. European Journal of Zoological Research 3: 56-60.
41. Peris, S. I., J. F. Bilodeau, M. Dufour, and J. L. Bailey. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. Molecular reproduction development 74: 878-892. https://doi.org/10.1002/mrd.20686.
42. Revell, S., and R. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science 36: 77-86.
43. Safa, S., G. Moghaddam, R. J. Jozani, H. D. Kia, and H. Janmohammadi. 2016. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. Animal reproduction science 174: 100-106.

44. Saleh, R. A., A. Agarwal, E. Kandirali, R. K. Sharma, A. J. Thomas Jr, E. A. Nada, D. P. Evenson, and J. G. Alvarez. 2002. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. Fertility sterility 78: 1215-1224.
45. Sanocka, D., and M. Kurpisz. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive Biology Endocrinology 2: 1-7.
46. Shahverdi, A., M. Sharafi, H. Gourabi, A. A. Yekta, V. Esmaeili, M. Sharbatoghli, E. Janzamin, M. Hajnasrollahi, and F. Mostafayi. 2015. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. Theriogenology 83: 78-85. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.044
47. Silva, S. V., A. T. Soares, A. M. Batista, F. C. Almeida, J. F. Nunes, C. A. Peixoto, and M. M. P. Guerra. 2013. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. Animal Reproduction Science 137: 37-44.
48. Surai, P., E. Blesbois, I. Grasseau, T. Chalah, J.-P. Brillard, G. Wishart, S. Cerolini, and N. Sparks. 1998a. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry Molecular Biology 120: 527-533.
49. Surai, P., N. Fujihara, B. Speake, J. Brillard, G. Wishart, and N. Sparks. 2001. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen-Review. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 14: 1024-1050. https://doi.org/10.5713/ajas.2001.1024.
50. Surai, P., I. Ionov, I. Kostyuk, G. Wishart, B. Speake, R. Noble, A. Macpherson, and N. Sparks. 1997a. Effect of vitamin E and selenium in the cockerel's diet on lipid peroxidation in the spermatozoa. British Poultry Science 38: S54-S55.
51. Surai, P. F., S. Cerolini, G. J. Wishart, B. K. Speake, R. C. Noble, and N. H. Sparks. 1998b. Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. Avian Poultry Biology Reviews 9: 11-23.
52. Surai, P. F., T. Gaal, R. C. Noble, and B. K. Speake. 1997b. The relationship between the a-tocopherol content of the yolk and its accumulation in the tissues of the newly hatched chick. Journal of the Science of Food and Agriculture 75: 212-216.
53. Surai, P. F., I. I. Kochish, M. N. Romanov, and D. K. Griffin. 2019. Nutritional modulation of the antioxidant capacities in poultry: the case of vitamin E. Poultry science 98: 4030-4041.
54. Tabatabaei, S., R. Batavani, and E. Ayen. 2011. Effects of vitamin E addition to chicken semen on sperm quality during in vitro storage of semen. In: Veterinary Research Forum. p 103-111.
55. Towhidi, A., and J. Parks. 2012. Effect of n-3 fatty acids and α-tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 29: 1051-1056.
56. Türk, G., M. Sönmez, M. Aydin, A. Yüce, S. Gür, M. Yüksel, E. H. Aksu, and H. Aksoy. 2008. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. Clinical nutrition 27: 289-296. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2007.12.006.
57. Virden, W., J. Thaxton, A. Corzo, W. Dozier III, and M. Kidd. 2007. Evaluation of models using corticosterone and adrenocorticotropin to induce conditions mimicking physiological stress in commercial broilers. Poultry Science 86: 2485-2491. https://doi.org/10.3382/ps.2006-00215.